



TITLE:

尿路上皮癌の診断・治療への分子生物学的アプローチ

AUTHOR(S):

笥, 善行

CITATION:

笥, 善行. 尿路上皮癌の診断・治療への分子生物学的アプローチ. 泌尿器科紀要 1999, 45(8): 583-588

ISSUE DATE:

1999-08

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/114094>

RIGHT:

尿路上皮癌の診断・治療への分子生物学的アプローチ

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 小川 修教授)

寛 善 行

MOLECULAR BIOLOGICAL TESTING FOR DIAGNOSIS
AND TREATMENT OF UROTHELIAL CANCER

Yoshiyuki KAKEHI

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

Detection of urinary telomerase activity is superior to the conventional urine cytological examination in terms of sensitivity for diagnosis of low grade urothelial cancers. Several causative factors including pyuria and hematuria which might have affected falsely positive and negative rates of urinary telomerase activity were investigated but their influence seemed negligible. As for progression from superficial to invasive urothelial cancers, destruction of the basement membrane underlying tumor is considered as an important event in the initial step of invasion. Our immunohistochemical analyses revealed that expression of type IV collagen in the basement membrane was reduced or disappeared in more than half of grade 2 to 3, pTa urothelial cancers. Overexpression of p53 tumor suppressor and/or mdm2 oncoprotein was strongly correlated with this basement membrane destruction. Urothelial cancers harboring p53 aberration may be resistant to cisplatin-based chemotherapy because of impairment of apoptosis induction. The relationship between chemosensitivity and p53 status in urothelial cancers was investigated, and a favorable response to neoadjuvant chemotherapy was found in tumors without p53 aberration.

(Acta Urol. Jpn. 45: 583-588, 1999)

Key words: Urothelial cancer, Telomerase, Matrix metalloproteinases, p53, mdm2

緒 言

表在性膀胱癌を治療する上で、頻回に繰り返す多中心性再発は診断の難しさや患者の QOL の面からも大きな問題である。この点に関して、内視鏡診断の回数を減じうる非侵襲的診断法が分子生物学的解析を基盤として登場しつつある。一方、再発を繰り返す間に、予期せぬ浸潤癌への移行に直面することも少なくない。浸潤性尿路上皮癌に対しては、cisplatin を主体とした化学療法が手術療法と共に治療の大きな柱となっているが、その奏功度を予め予知できれば患者選択の上で恩恵は測りしれない。本稿では尿路上皮癌の診断や治療面への分子生物学的アプローチを、われわれのこれまでの解析結果を中心に概説する。

I. 尿路腔内再発の早期診断へのアプローチ

A) 背景

尿路上皮癌患者尿中には、その比率こそ様々ながら癌細胞由来の剝離細胞が含まれると考えられる。これが従来の尿細胞診の診断基盤であったが、高分化移行上皮癌では剝離する癌細胞の比率が極端に少ないことや細胞の異型性に乏しいことなどから、どの施設でも感度が概ね20%以下にとどまっている。一方、尿中剝

離細胞を用いた分子診断は PCR 法の開発と共に急速に進んだ。われわれは、p53 遺伝子に変異を有する尿路上皮癌患者の尿中に、変異特異的プライマーを用いて、nested PCR の原理を応用して変異陽性細胞を検出する方法を開発した¹⁾ 一方、膀胱癌ないし尿路上皮癌に特異的な酵素活性や抗原性、もしくは癌に特異的な酵素活性などを利用した尿の分子診断法も実用化が進みつつある。ここでは、癌特異的ともいえる細胞の不死化に関連した telomerase 活性を、尿沈渣細胞中に検出することによる尿路上皮癌の分子診断の有用性と限界について解析する。

B) 対象と方法

1996年に行った最初の調査では、42例の膀胱癌患者の腫瘍組織と43例の患者尿および健常人12名の尿を解析した²⁾ この調査では、主として尿細胞診との感度および特異度の比較を行った。Telomerase 活性は Kim ら³⁾ による telomeric repeat amplification protocol (以下 TRAP 法) により測定した。1997年に行った調査では、65例の尿路上皮癌患者 (膀胱癌60例、腎盂癌4例、尿管癌1例) および33例の非尿路性器癌患者と25例の健常人の尿を解析した⁴⁾ この研究では telomerase 活性は telomerase PCR ELISATM (Boehringer-Mannheim) を用い半定量的に測定し、

Table 1. Grade 別の尿中テロメラーゼ活性と尿細胞診の検出感度の比較

Grade	患者数	テロメラーゼ陽性率 (95% CI)			尿細胞診陽性率 (95% CI)
		自然尿	洗浄尿	両者併用	
1	12	45% (17-77)	67% (35-90)	75% (43-95)	8% (0-38)
2	28	58% (37-77)	93% (76-99)	96% (82-100)	46% (28-66)
3	5	60% (15-95)	75% (19-99)	80% (28-99)	100% (48-100)

Grade 1 では自然尿, 洗浄尿, 両者併用のすべてのテロメラーゼ陽性率が尿細胞診より有意に高かった (各々の P 値は0.046, 0.008, 0.005). Grade 2 では洗浄尿, 両者併用でのテロメラーゼ陽性率が尿細胞診より有意に高かった (各々の P 値は0.001).

偽陽性や偽陰性に影響を与える因子について解析した.

C) 結 果

第1の調査では, 42例から得た腫瘍組織の telomerase 活性を解析したところ41例とほぼ全例で陽性であった. この中には12例の grade 1 症例が含まれており, telomerase 活性が高分化の膀胱癌でもほとんど常に陽性を示すことを示している. 次に患者尿として, 術前の自然排尿サンプルと術直前の膀胱内カテーテルよりの洗浄尿を別々に解析した. 全体の telomerase 活性の感度は自然尿で55% (95% CI: 39~70%), 洗浄尿では84% (95% CI: 69~93%) で, 尿中に含まれる癌細胞由来の剝離細胞数が感度に影響を与えることを示唆している. Table 1 に組織学的 grade 別の感度を尿細胞診と比較して示す. Grade 1 および2においてそれぞれ細胞診より有意に高感度であった. 一方, 12名の健常人の尿沈渣からは1例も telomerase 活性は検出しなかった.

第2の調査では, まず65例の尿路上皮癌患者の自然尿と58例の非尿路性器癌患者もしくは健常人尿の telomerase 活性を, telomerase PCR ELISA 法で測定した. その吸光度の分布を Fig. 1 に示す. 非尿路性器癌患者もしくは健常人尿の吸光度の平均値に2倍の標準偏差を加えた値を cut-off としたところ, 尿路上皮癌患者尿での感度は57%であった. 一方, この cut-off 値で, 非尿路性器癌患者もしくは健常人尿でも少数例だが telomerase 活性陽性と判定された

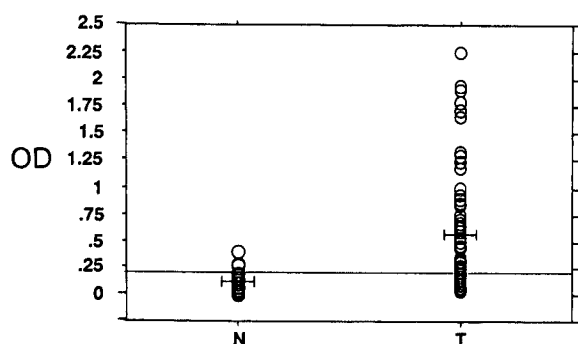


Fig. 1. Telomerase PCR ELISA 法で測定した非尿路性器癌患者もしくは健常人尿 (N) と尿路上皮癌患者尿 (T) 中の telomerase 活性.

Table 2. TRAP ELISA 法による自然排尿中テロメラーゼ活性陽性率

尿路上皮癌	37/65 (57%)
BPH	2/15 (13%)
尿路結石	0/7 (0%)
尿路感染	0/7 (0%)
その他*	1/4 (25%)
健常人	1/25 (4%)

*: 神経因性膀胱2例, 慢性腎不全2例.

Table 3. 非尿路上皮癌患者尿沈渣所見と TRAP ELISA 法による尿中テロメラーゼ活性

尿沈渣所見	TRAP		計
	陽性	陰性	
膿尿	1	11	12
血尿	0	2	2
血膿尿	1	3	4
正常	2	38	40

尿沈渣異常群全体での偽陽性率11%, 正常群5% (P=0.395).

(Table 2). さて, 骨髓細胞やその他の一部の正常幹細胞にも telomerase 活性が弱いながら認められることが報告されている. したがって, 強い膿尿は偽陽性の要因になる可能性がある. Table 3 は非尿路性器癌患者もしくは健常人尿での尿沈渣所見と telomerase 活性の比較を示す. 膿尿ないし血膿尿ないし血尿を示した18例中2例 (11%) で telomerase 活性が陽性であったのに対して, 正常な沈渣所見の40例では2例 (5%) が telomerase 活性陽性で, 両者間で偽陽性率に有意差はなかった.

D) 考 察

尿沈渣中の telomerase 活性を指標とした膀胱癌の診断は, low grade 腫瘍での感度が細胞診より明らかに優れている. 近年, BTA test, BTA stat, NMP22, FDP などの分子マーカーが開発され, telomerase 活性と共にその臨床応用が検討されつつある⁵⁾. 最近の米国の prospective study でも, 感度の点では BTA stat と telomerase 活性が優れ, その他の分子マーカーも総じて尿細胞診より高い感度を示している. 特異度は尿細胞診と telomerase 活性が高く, 総合すると telomerase 活性が現時点では膀胱癌のスクリーニ

ングとして最も優れているようだ⁶⁾。しかし, telomerase 活性を測定することで TUR 後の膀胱鏡の回数を減じることができるかどうかは慎重を要すると思われる。われわれは現在, TUR 直後の尿中 telomerase 活性と TUR 後3カ月, 6カ月の早期再発との関係を prospective に解析中である。

II. 悪性進展を規定する因子の解析

A) 背景

表在性尿路上皮癌の浸潤癌への悪性進展は約10~15%程度あるとされ, その予測は難しく治療方針の転換が遅れがちで, 生命予後に直結する問題となっている。われわれは表在性尿路上皮癌における基底膜の変成を type IV collagen を指標として解析し, これに関与する分子異常を検討した^{7,8)}

B) 対象と方法

60例の尿路上皮癌 (膀胱癌: 46, 上部尿路癌+膀胱癌: 10, 上部尿路癌: 4) の主腫瘍と随伴上皮内癌 (以下 CIS) 病変を解析した。病理組織学的病期は pTa: 23例, pTis: 18例, pT1: 6例, pT2-4: 13例で, pTis 以外では13例が随伴 CIS 病変を有していた。腫瘍部の基底膜の変成の有無は type IV collagen を指標とし, 腫瘍細胞における p53 およびその negative regulator である mdm2 蛋白の過剰発現, さらに matrix metalloproteinase (MMP) 群 (MMP-1, -2, -9) の up-regulation の有無について免疫組織化学的に解析した⁷⁾

上記症例中, 尿サンプルを採取しえた33例については, 尿中 MMP-9 および tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の濃度を one-step sandwich immunoassay 法により測定した⁸⁾

C) 結果

主腫瘍部における p53 および mdm2 の過剰発現 (p53 の過剰発現は p53 の遺伝子変異に起因した半減期の遅延を示し, mdm2 の過剰発現はほとんどの場合遺伝子増幅を伴わない発現レベルでの過剰誘導と解釈される) と, 基底膜の変成の頻度を Table 4 に示す。pT1 以上の腫瘍および pTis は当然高率に type IV collagen の発現消失が観察されているが, pTa 腫瘍でも grade 2 ないし3では過半数で基底膜の変成が起きていることが注目される。p53 および mdm2 の過剰発現はこれまでの報告と同様に high grade, high stage 症例で高く, CIS でも高頻度であった。Table 5 は type IV collagen の発現消失の有無が pTa-pT1 腫瘍において p53 および mdm2 の異常の有無と強く相関することを示している。一方, CIS は浸潤癌への移行頻度が高く, 遺伝子異常の面からは p53 遺伝子の変異が早期から起こることが報告されている。Table 6 は原発性 CIS および随伴

Table 4. 尿路上皮癌の主腫瘍部における基底膜 type IV collagen の発現消失, p53 の核内異常蓄積および mdm2 の過剰発現の stage/grade 別の頻度

Tumor stage, grade	p53 (+) (%)	mdm2 (+) (%)	Type IV collagen (-) (%)
pTa, G1	0/9	0/9	0/9
pTa, G2-G3	7/14	3/14	8/14
pT1, G2-G3	3/6	2/6	5/6
pT2-4, G2-G3	7/13	4/13	12/13
pTis, G2-G3	12/18	5/18	15/18

Table 5. pTa-pT1 腫瘍29例における基底膜 type IV collagen の発現消失の有無と随伴 CIS 病変の有無および mdm2 の過剰発現を含めた p53 と異常の有無との関係

	Type IV collagen (-)*	Type IV collagen (+)**	P
CIS (+)	4	4	0.68
CIS (-)	8	13	
p53/mdm2 (+)***	11	2	0.00002
p53/mdm2 (-)	1	13	

*: 発現消失, **: 発現維持, ***: p53 の核内異常蓄積もしくは mdm2 の過剰発現を認める腫瘍。

Table 6. 原発性および随伴性 CIS 病変における基底膜 type IV collagen の発現消失と病理学的異型度, mdm2 の過剰発現, p53 の核内異常蓄積およびその両者のいずれかの異常の有無との関係

	Type IV collagen* (-)	Type IV collagen* (+)	P
Grade 2	11	5	0.39
Grade 3	13	2	
mdm2 (+)**	9	0	0.08
mdm2 (-)	15	7	
p53 (+)***	16	1	0.03
p53 (-)	8	6	
p53/mdm2 (+) [§]	23	1	0.00006
p53/mdm2 (-)	1	6	

*: 発現消失 (-), 発現維持(+), **: 過剰発現, ***: 核内異常蓄積, §: p53 の核内異常散蓄もしくは mdm2 の過剰発現のいずれかもしくは両者。

CIS 病変における type IV collagen の発現消失の有無と p53 の異常もしくは mdm2 の過剰発現の有無が密接な関連性があることを示している。基底膜の type IV collagen を変成させる酵素として幾つかの matrix metalloproteinase が考えられるが, MMP-1, -2, -9 などの発現上昇の有無は p53 もしくは mdm2 の過剰発現の有無と強い相関があった。MMP-1, -2, -9 の発現上昇の頻度と腫瘍の grade および stage との関係を Table 7 に示す。この中では MMP-9 の発現増加が腫瘍の進展と最も関連が高かった。そこで,

Table 7. MMP-1, -2, -9 の腫瘍での発現上昇の有無, 基底膜 type IV collagen の発現消失と異型度・進展度との関係

Tumor stage, grade	MMP-1 (+)	MMP-2 (+)	MMP-9 (+)	Col 4 (-)
pTa, G1	2/9	0/9	4/9	0/9
pTa, G2-G3	5/14	2/14	7/14	8/14
pT1, G2-G3	4/6	0/6	3/6	5/6
pT2-4, G2-G3	8/13	3/13	9/13	12/13
pTis, G2-G3	13/18	5/18	16/18	15/18

+: 発現上昇, -: 発現消失.

手術前に尿サンプルが保存できた33例 (pTa: 10, pTis: 16, pT1-3: 7) について尿中の MMP-9 および TIMP-1 の濃度を測定し, 特に表在性腫瘍での MMP-9 の発現増加の有無や type IV collagen の変性の有無との関連などを解析した (Table 8). 患者尿では MMP-9 は全例で検出感度以上に検出されたが (範囲: 0.90~15.20 ng/ml), 同時に解析した16例の健常人尿ではすべて検出限界以下 (範囲: 0.00~0.068 ng/ml) であった. 一方 TIMP-1 は患者18例で検出されたが (範囲: 1~30.0 ng/ml), 健常人では全例検出感度以下であった. 尿中の MMP-9 や TIMP-1 の濃度と腫瘍の grade や stage とは関連がなかった. MMP-9 と TIMP-1 の尿中濃度の間には弱い相関が見られたが ($r^2=0.295$), この傾向は, 基底膜の type IV collagen の発現が保持されている表在性腫瘍ではより顕著であった ($r^2=0.551$).

D) 考 察

表在性尿路上皮癌においても基底膜の変性は高頻度起こっており, mdm2 の過剰発現も含めた p53 の機能異常と関連が深いことが示唆された. p53 の機能異常が matrix metalloproteinase の発現誘導に結びつく途中のカスケードはまだ明らかではないが, 現在 matrix metalloproteinase inhibitor の開発が精力的に進められており, 将来的には p53 の機能異常を有するような表在性癌患者への悪性進展の予防投与としての有用性が検討されることになると考えられる.

Table 8. 表在性尿路上皮癌 (pTa: 10例, pTis: 16例) での MMP-9 の腫瘍内発現上昇の有無, 尿中 MMP-9 の濃度, 尿中 TIMP-1 の濃度と基底膜 Type IV collagen との関係

	pTa tumor		pTis tumor	
	Type IV collagen status		Type IV collagen status	
	Preserved (n=6)	Reduced (n=4)	Preserved (n=3)	Reduced (n=13)
MMP-9 expression* -	2	1	1	1
MMP-9 expression* +	4	3	2	12
Urine MMP-9** <2.5 ng/ml	2	3	1	6
Urine MMP-9** : 2.5 ng/ml or greater	4	1	2	7
Urine TIMP-1 <1 ng/ml	3	3	1	8
Urine TIMP-1 : 1 ng/ml or greater	3	1	2	5

*: $p=0.0283$. **: 尿中 MMP-9 濃度は, 測定しえた26例の中央値で区分した.

III. 化学療法の効果予測へのアプローチ

A) 背 景

進行尿路上皮癌において cisplatin を基本とした多剤併用化学療法は重要な治療法の一つである. しかし, 過半数で PR 以上の効果が期待できる反面, 感受性を予測する指標がないため, ネオアジュバント化学療法を行う際には特にジレンマを感じるのも事実である. p53 変異を有する細胞は, cisplatin を主体とした化学療法に対し抵抗性であるとの *in vitro* の実験結果は, p53 の機能異常がアポトーシス耐性に関連するとの仮説を支持する⁹⁾ しかし, 逆に p53 の機能異常を有する細胞の方がより感受性であるとの実験結果も最近報告され¹⁰⁾, 依然結論は出ていない. 膀胱癌においては, 米国の Memorial Sloan-Kettering Cancer Center のグループが cisplatin を主体とした化学療法を施行された浸潤性膀胱癌患者を解析し, p53 過剰発現がある症例は予後不良であることを報告している¹¹⁾ 一方, 南カルフォルニア大学のグループは膀胱癌の根治手術後の補助化学療法の恩恵が, p53 の発現異常のある患者群にのみ見られると報告している¹²⁾ この2つの報告は一見正反対の結論となっているが, 患者の背景因子や化学療法の役割が違ふことや, 化学療法の奏功率そのものを調べたものではない点に注意を要する.

われわれは化学療法の奏功性と p53 および mdm2 の異常の有無に関し, 化学療法をネオアジュバントとして施行した患者群と転移巣などへの治療目的で施行された群に分けて解析した¹³⁾

B) 対象と方法

Cisplatin を主体とした全身化学療法をネオアジュバント療法として施行し, その後根治術を行った原発臓器限局移行上皮癌症例32例 (グループ I) と, 局所進展高度のため手術不能か, もしくは遠隔転移を有する移行上皮癌症例28例 (グループ II) の, 原発巣の化学療法前の腫瘍組織における p53 および mdm2 の発現状態を免疫組織化学的に retrospective に解析した.

Table 9. p53 および mdm2 の発現異常とシスプラチンを基本とした化学療法に対する奏効率との関係

	評価可能症例数	著効症例数	有効症例数	奏効率 (%)
グループ I *				
全症例	32	8	15	71.9
p53・mdm2 発現有無別:				
p53 (-)	18	7	9	88.9
p53 (+)	14	1	6	50.0
mdm2 (-)	22	7	10	77.3
mdm2 (+)	10	1	5	60.0
p53 (-) かつ mdm2 (-)	13	6	6	92.3
p53 (+) または mdm2 (+)	19	2	9	57.9
グループ II **				
全症例	28	3	13	57.1
p53・mdm2 発現有無別:				
p53 (-)	14	3	4	50.0
p53 (+)	14	0	9	64.3
mdm2 (-)	22	3	11	63.6
mdm2 (+)	6	0	2	33.3
p53 (-) かつ mdm2 (-)	12	3	4	58.3
p53 (+) または mdm2 (+)	16	0	9	56.3

*: ネオアジュバント化学療法群, **: 化学療法単独群 (局所進展または遠隔転移症例),
 (観察期間) グループ I 28 (7~122) カ月, グループ II 11.5 (~77) カ月.

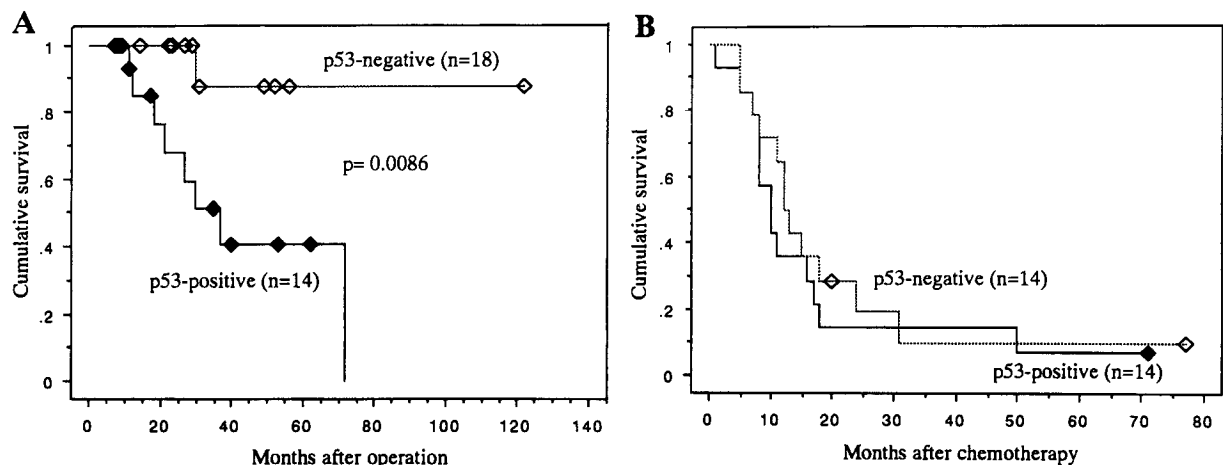


Fig. 2. p53 の核内異常蓄積の有無とネオアジュバント群 (A) と化学療法単独群 (B) での化学療法後の疾患特異的実測生存率.

C) 結 果

奏効率はグループ I では p53 の過剰発現のない群で有意に高かったが, この傾向は mdm2 の過剰発現を勘案した p53 の機能異常としてみた場合, 有意差は強調されなかった. 一方, グループ II では奏効率と p53 の間に有意差は認められなかった (Table 9). 疾患特異的生存率を解析したところ, グループ I ではやはり p53 の過剰発現のない群で有意に予後良好であったが, こういった傾向はグループ II では認められなかった (Fig. 2).

D) 考 察

今回の結果, 腫瘍細胞の p53 遺伝子産物の過剰発現が陰性 (これらのほとんどは wild type の p53 を有すると考えられる) の患者ではネオアジュバント化

学療法の恩恵を受ける可能性が高いことを示唆している. しかし, 治療の恩恵を受けない患者を予測するのに, p53 過剰発現の有無, ないしは mdm2 の過剰発現を勘案した p53 の機能異常の有無の評価だけでは不十分であるともいえる.

結 語

尿路上皮癌の発生, 悪性進展, 治療への反応性に関する新たな分子マーカーが続々と登場する中, これらを利用した分子診断が既存の診断法を補えるか, 患者の負担を軽減できるか, さらに患者の個別化による細かな治療方針の決定に結びつけられるかといった, きわめて現実的で具体的な評価が今後の大きな課題になると思われる.

文 献

- 1) Yamada H, Kakehi Y, Okuno H, et al.: Detection of tumor-derived DNA in exfoliated cells of urine sediments with a novel quantitative PCR method based on allele-specific PCR. *Cancer Lett* **126**: 111-118, 1998
- 2) Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, et al.: Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* **89**: 724-730, 1997
- 3) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**: 2011-2015, 1994
- 4) Akao T, Kakehi Y, Xiu-Xian Wu, et al.: Semi-quantitative analysis of telomerase activity of exfoliated cells in urine of patients with urothelial cancers: causative factors affecting sensitivity and specificity. *Urol Oncol* **3**: 118-124, 1997
- 5) Landman J, Chang Y, Kavalier E, et al.: Sensitivity and specificity of NMP-22, telomerase, and BTA in the detection of human bladder cancer. *Urology* **52**: 398-402, 1998
- 6) Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al.: Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. *J Urol* **161**: 388-394, 1999
- 7) Özdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al.: Strong correlation of basement membrane degradation with p53 inactivation and/or mdm2 overexpression in superficial urothelial carcinomas. *J Urol* **158**: 206-211, 1997
- 8) Özdemir E, Kakehi Y, Okuno H, et al.: Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. *J Urol* **161**: 1359-1363, 1999
- 9) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, et al.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**: 957-967, 1993
- 10) Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, et al.: Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* **381**: 713-716, 1996
- 11) Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, et al.: Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol* **13**: 1384-1390, 1995
- 12) Cote RJ, Esrig D, Groshen S, et al.: p53 and treatment of bladder cancer. *Science* **385**: 123-124, 1997
- 13) Kakehi Y, Özdemir E, Habuchi T, et al.: Absence of p53 overexpression and favorable response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy in urothelial carcinomas. *Jpn J Cancer Res* **89**: 214-220, 1998

(Received on May 25, 1999)
(Accepted on June 30, 1999)